

Title	Studies on the structure and function of RNase HIII from <i>Bacillus stearothermophilus</i>
Author(s)	全, 賢基
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46899">https://hdl.handle.net/11094/46899</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 <sup>チョン</sup>全 <sup>ヒョン</sup>賢 <sup>ギ</sup>基

博士の専攻分野の名称 博 士 (工 学)

学 位 記 番 号 第 20271 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

工学研究科物質・生命工学専攻

学 位 論 文 名 Studies on the structure and function of RNase HIII from *Bacillus stearothermophilus*  
(*Bacillus stearothermophilus* 由来 RNase HIII の構造・機能に関する研究)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 金谷 茂則

(副査)

教 授 宮田 幹二

教 授 菊地 和也

教 授 福住 俊一

教 授 横山 正明

教 授 高井 義造

教 授 伊東 一良

## 論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、RNase HIIIの分子機構を解明し、RNase Hの分子多様性の理解に、構造生物学的な観点から新たな知見を与えることを目的とした。第一章では、中等度好熱菌 *B. stearothermophilus* から RNase HIII (Bst-RNase HIII) 遺伝子のクローニングを行い、組換え蛋白質の諸特性について常温菌 *B. subtilis* 由来 RNase HIII (Bsu-RNase HIII) と比較した。その結果、Bst-RNase HIIIはBsu-RNase HIIIと同様の酵素的諸特性を示すが、高い耐熱性を示すことが分った。また、本酵素は高純度且つ大量に取得できることから、RNase HIIIの構造・機能相関を研究するための材料として適することが分った。第二章では、Bst-RNase HIIIの結晶構造を、RNase HIIIの立体構造として世界ではじめて決定した。その結果、Bst-RNase HIIIの構造は大きく分けてN末端ドメインとC末端ドメインからなり、C末端ドメインは大ドメインと小ドメインに分けられることを明らかにした。C末端ドメインの構造は古細菌 RNase HIIと類似していることが明らかになった。また、RNase HIIIの活性中心の構造はRNase HIやHIIとよく類似していることを明らかにした。さらに、N末端ドメインがアミノ酸配列的にも三次構造的にもTATA-box binding protein (TBP) に類似していることをはじめて明らかにした。第三章では、結晶構造に基づいて設計したBst-RNase HIIIの変異型蛋白質の解析を行い、各ドメインの、基質認識機構、触媒機構について解析した。活性中心変異体の酵素活性や基質との相互作用を解析することにより、RNase HIIIの触媒機構はRNase HIやRNase HIIと類似していることを明らかにした。N末端ドメイン、C末端ヘリックス、あるいはその両方を削除した変異体の酵素活性や基質との相互作用を解析することにより、これらの領域は基質結合に関与することを明らかにした。また、N末端ドメインが基質結合において主要な役割を果たすことを明らかにした。さらにBst-RNase HIIIの基質切断部位特性を決める因子は大ドメインにあることを明らかにした。Bst-RNase HIIIが基質に結合すると、蛋白質、基質、又はその両方の構造が大きく変化することを提案した。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、これまでほとんど解析されていなかった RNase HIII の分子機構を、初めて構造的に特徴付けした点で意義深い。第二章では、活性に必要な金属イオンと Bst-RNase HIII との複合体結晶構造を明らかにした。また、第三章では、保存されている 4 残基の酸性アミノ酸が活性部位を構成することを明らかにした。これらの結果、RNase H は Type 1 RNase H であっても Type 2 RNase H であっても同様の触媒機構を有することが確かめられた。一方、第三章において、RNase HIII はこれまで解析された RNase H にはない特徴的な基質結合部位 (TBP 様 N 末端ドメイン) を持つことを明らかにした。このことから、RNase H は基質結合部位と触媒部位がシャッフリングされることによって、その分子機能が多様化したことを提案した。

本研究はさらに、RNase HIII の N 末端ドメインが、アミノ酸配列、構造、機能のすべての点で TBP と類似していることを明らかにした点で意義深い。RNase HIII と TBP の類似性は、アミノ酸配列を比較するだけでは見出されなかったもので、本研究は、立体構造を比較してはじめて類似性を見出すことができるというモデルケースになるかもしれない。TBP は細菌には存在せず、RNase HIII は細菌からしか見つかっていない。しかし、これらの蛋白質に進化的関係がないとはいえない。なぜなら、ある蛋白質が、他の蛋白質のドメインとして存在する場合があるからである。そこで今後、RNase HIII の N 末端ドメインが DNA と結合するかどうか、RNA/DNA ハイブリッドとどのような分子機構で結合するのかを解析し、分子機構の面でも TBP との類似性が見出されるかどうか比較することは意義深いと考えられる。これによって、TBP と RNase HIII の N 末端ドメインとの進化的な関係の有無を、さらに裏付けることができるものと思われる。TBP は TATA-box DNA 配列に結合するのみならず、他の蛋白質と相互作用するということに、その機能の本質がある。RNase HIII の N 末端ドメインも基質結合能以外に、他の蛋白質や DNA と相互作用するのだろうか。酵母由来 RNase H2 の場合、原核生物由来 RNase HII と異なり、三種のポリペプチドからなる複合体として機能することが報告されている。RNase H も、相互作用する相手を変化させることで、生命システムを多様化させる原動力のひとつになっているのかもしれない。

以上のように、本論文は、RNase HIII の分子メカニズムを解明することで、構造生物学的な観点から RNase H の分子多様性に新たな知見を与えたものである。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。